R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

AUG 1946
INSTITUTE

163

O. VERONA E M. L. PAGANINI

SULLA MICROFLORA DEGLI ACETI ITALIANI.

Il Bact. acetigenum Henn.

Estratto dal *Bollettino della Facoltà di Agraria*
Vol. XIV - 1938 - XVI

PISA, PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1938 XVI

O. VERONA E M. L. PAGANINI

SULLA MICROFLORA DEGLI ACETI ITALIANI.

Il Bact. acetigenum HENN.

RIASSUNTO: *Iniziandosi studi sopra gli acetici di prodotti italiani è stato, per ora, sottoposto ad esame il* Bact. acetigenum HENN. *determinandosene la morfologia, i caratteri colturali e quelli fisiologici, fin qui noti soltanto sommariamente.*

Occorre riconoscere come la microflora acetica, nonostante gli studi fin oggi apparsi sull'argomento, non si presenti molto bene descritta. Sopratutto manca, delle singole specie, il rilievo di sufficienti caratteri colturali dall' insieme dei quali possano derivare ulteriori elementi discriminatori da servire alla diagnosi differenziale. Ciò si rende maggiormente necessario in quanto la sistematica degli acetici non può trarre grande ausilio dall' esame dei caratteri morfo-fisiologici, nonostante di essi facciano uso i sistemi moderni. Infatti, difficile è percepire la mobilità; difficile è scoprire tipiche differenze di forma o di dimensioni, data la comune grande variabilità in esse; laboriosa appare la ricerca delle variazioni dell'attività ossidante. In altri termini, data la comunanza dei caratteri fondamentali, il quadro sistematico appare difficile a stabilirsi.

Da ciò gli artificiosi sistemi come quello – valga uno per tutti – di BERGEY in " Determinative Bacteriology „ il quale, accettato il nome generico di *Acetobacter* (BEIJERINCK, 1901) così distingue:

Mobilità generalmente assente:

a – formazione di ac. acetico da destrosio, alcool etilico e propilico e da glicol:

1 – *A. Pasteurianus*
2 – *A. acetus*
3 – *A. Kützingianus*
4 – *A. Lindneri*

b – formazione di ac. acetico da destrosio, galattosio, alcool etilico e propilico e glicol:

5 – *A. acetosus*

c – formazione di ac. acetico da destrosio, galattosio, alcool etilico e propilico, glicol e saccarosio:

6 – *A. xylinus*

d – formazione di ac. acetico da alcool:

7 – *A. ascendens*

8 – *A. plicatus*

Mobili:

a – formazione di ac. acetico da destrosio, alcool etilico e propilico e da glicol:

9 – *A. acetigenus*

b – formazione di ac. acetico da destrosio, alcool etilico e propilico, glicol, arabinosio, levulosio, maltosio, lattosio, raffinosio, destrina, glicerina e mannite.

10 – *A. oxydans*

11 – *A. industrius.*

Senza entrare in merito a discussioni di ordine generico, per le quali è sempre aperta la questione se debbasi o non accettare, ai fini di una distinzione di gruppo, un carattere fisiologico notoriamente soggetto spesse volte a profonde modificazioni [1], si rileva nel siste-

[1] – Noi ci atteniamo ancora alla antica ma pur sempre sufficiente e sopratutto chiara sistematica di MIGULA emendata da L. et N. onde gli acetigeni, mobili o non mobili, rientrano, essendo asporigeni, nel gen. *Bacterium.*

Il criterio fisiologico proposto da ORLA-JENSEN non ha altro pregio che quello di avere segnato un nuovo orientamento nella sistematica dei germi. E, per qualche gruppo, può anche essere accettato quando il carattere fisiologico preso in considerazione siasi dimostrato specifico e fisso. Per es. per i fissatori di azoto, per i nitrificanti, i cellulositici.

Ma per gli acetici come poter sopravalutare un carattere (l'ossidazione dell'al-

ma di BERGEY l'assenza di molte specie descritte come acetigene (per es. *Bact. aceti* HANSEN, *Bact. rancens* BEY., *Bact. vini acetati* HENNEBERG, *Bact. xilinoides* HENN., *Bact. orleanense* HENN., ecc., ecc.); inoltre la sistemazione in un unico gruppo, senza indicazione dei caratteri differenziali, di due o più specie; e, infine, a tacere d' altro, la esclusione di ogni carattere colturale nella chiave analitica del genere.

HENNEBERG, che molto si è occupato della microflora degli acetici, distingue nel suo "Handbuch der Gärungsbakteriologie„, quattro gruppi prendendo a carattere discriminatorio la provenienza del germe o la velocità di trasformazione dell' alcool. È una classificazione di comodo, seguita del resto anche da altri, ma viziata per tenere conto dell'*habitat* che non risulta affatto specifico di una piuttosto che di un' altra forma.

LAFAR (1911) limitò i gruppi a tre e tali sono mantenuti da PEROTTI (1925) distinguendosi: 1° batteri acetici della birra e del vino: 2° b. acetici rapidi; 3° b. acetici mucillaginosi. È stato introdotto in tale sistema il carattere che porta alla formazione di membrane spesse e resistenti per l'abbondante mucillagine che si produce; carattere questo da prendersi, forse, in maggiore considerazione avendosi, per contro, specie formanti velo sottile e labile.

Va da sè, peraltro, che il terzo gruppo di LAFAR, come del resto il secondo, contrastano con il primo in quanto acetici rapidi ed a. mucillaginosi è pure facile di isolarli da birra e da vino.

In Italia mancano studi sistematici sulla microflora degli aceti. Un solo lavoro recente, ad opera di SACCHETTI *(Boll. della Sez. Ita-*

---

cool in ac. acetico) che può essere comune anche ad altre forme diversamente classificabili per possedere più importanti attributi?

E così dicasi del sistema relativamente recente di PRIBRAM (Klassifikation der Schizomyceten, ed. Franz Deuticke 1933) il quale, confondendo la già confusa e caotica nomenclatura, ha ripristinato per gli acetici il gen. *Ulvina* di KÜTZING che pone, con i gen. *Proteus* HAUSER, *Plocamobacterium* LÖWI, *Leptotrichia* TREV., nella Fam. *Ulvinaceae.*

liana d. Soc. Int. di Microbiologia, 1937), segnala la presenza nell'aceto balsamico modenese di uno *Zygosaccharomyces*.

La presenza di lieviti negli aceti di birra e di vino, in uno od in altro modo prodotti, non stupisce data l' origine del materiale di partenza. E noi stessi, nelle nostre indagini, ne abbiamo isolati diversi, inclusi alcuni asporigeni. Ne riferiremo a parte in vista di mettere in evidenza, più che altro, il loro potere acidofilo poichè in questo momento non si vede l'influenza da essi eventualmente esercitata nel processo di acetificazione che è un fenomeno di tutt'altra natura di quello determinato, normalmente, dai lieviti.

Nella presente Nota ci limitiamo a riferire sul *Bact. acetigenum* descritto da HENNEBERG piuttosto sommariamente ed isolato con singolare frequenza da " madri „ consistenti, voluminose, di aspetto quasi carnoso. Ci risparmiamo la descrizione di *Bact. xylinum* BROWN e di *Bact. Pasteurianum* HANSEN (meno frequentemente isolati) perchè abbastanza noti. Se del caso saranno fatti soltanto riferimenti allo scopo di mettere meglio in evidenza le differenze specifiche.

Ad ogni modo, prima di procedere alla descrizione di *Bact. acetigenum* HENN. premettiamo le caratteristiche analitiche degli aceti dai quali, a volte insieme ad altre forme, è stato isolato.

TAB. I. – Analisi chimiche degli aceti studiati microbiologicamente.

Provenienza	ac. tot. in ac. acetico %	estratt. secco ‰	ceneri ‰	tartrat. ac. di potass. ‰	ac. tartarico libero ‰	p. sp. a 15°C	Specie isolate
Reggio Emilia	3,259	18,900	3,796	2,039	1,541	10,142	*B. acetigenum*
Pisa I	2,670	20,012	6,968	2,780	0,780	10,002	id.
Pisa II	6,010	14,260	1,970	3,870	7,530[1]	10,123	*B. Pasteurian.*
Spezia	5,100	22,380	4,800	1,520	2,800	10,153	*B. xylinum*

(1) – Stupisce l' elevata percentuale di ac. tartarico libero presente in questo aceto. Probabilmente trattasi di aceto adulterato al quale è stato aggiunto acido tartarico.

Inutile aggiungere che gli isolamenti venivano eseguiti da liquidi di arricchimento, allestiti con la classica formula pasteuriana, con aliquote dei quali si insemenzavano piastre all'agar-fagiuoli. Ricordiamo però che spesso uguali buoni risultati si ottenevano con la semina diretta salvo eventuali opportune diluizioni.

Il Bact. acetigenum Henneberg

Caratteri colturali.

Su piastre all'agar-fagiuoli saccarosato ed all' agar-malto, dopo 3 giorni a 24° C., colonie di mm. 1-2 di diametro, jaline, sferiche o

Fig. 1 – Colonie di *Bact. acetigenum* su agar-fagiuoli saccarosato dopo 4 giorni a 24° C.

subrotonde, semi-trasparenti, molto rilevate, sì che assumono aspetto quasi di perline. Osservate a piccolo ingrandimento presentano strut-

tura omogenea e orlo continuo. Sono poco aderenti al substrato ma consistentissime.

Toccate con l'ago si lasciano asportare completamente.

Trascorsi tre giorni esse aumentano di volume fino a raggiungere, quasi, i cinque mm. di diametro. Con il tempo non assumono particolari pigmentazioni, nè inducono modificazioni nei substrati.

Sugli agar solidificati in posizione inclinata gli strisci prendono sviluppo, tenuti a 24°C., tra il 2° e il 3° giorno con formazione di patina avente caratteri simili alla vegetazione delle colonie. Trattasi, cioè, di una patina continua, abbastanza estesa, jalina e semi-trasparente, superficiale, consistente, notevolmente rilevata ora omogeneamente, ora sotto forma di mammelloni a contorno continuo od anche sinuoso.

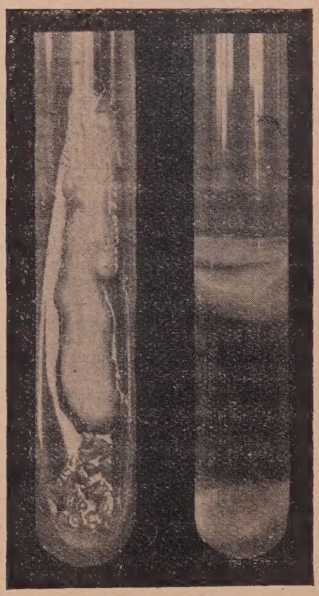

Fig. 2 – *Bact. acetigenum:* striscio su agar-fagiuoli saccarosato e coltura su birra dopo 7 giorni a 24°C.

La forma delle colonie ed il comportamento su agar inclinato si presentano per *Bact. acetigenum* alquanto tipicamente sì da farlo ben differenziare da molte altre forme che, ferma rimanendo la somiglianza di altri caratteri, presentano patine non lucenti o grinzose o non rilevate o leggermente pigmentate.

È il caso, per es., di *Bact. xilinum* il quale forma una patina sottile, quasi membranacea, lucente ma piuttosto secca e leggermente grinzosa, virante al bruno-chiaro con il tempo. Ed anche, sempre mantenendoci tra le forme isolate e con le quali era possibile di fare diretti confronti, di *Bact. Pasteurianum* che dà pure patine poco abbondanti, dapprima ialine poi bianche, superficiali, asciutte, opache, mem-

branaceo-poltacee, ad orlo degradante e leggermente frastagliato e solcato.

Su gelatina nutritiva in colture per infissione *Bact. acetigenum* sviluppa piuttosto scarsamente in superficie, non in profondità, senza liquefare.

In brodo di fagiuoli saccarosato, come su malto, su birra, su vino e su ogni altro mezzo liquido sperimentato (v. caratteri fisiologici) si forma in superficie una tipica membrana più o meno spessa a seconda della composizione del liquido ma talvolta raggiungente anche 1 cm. di altezza. Da prima si ha sviluppo di una massa gelatinosa ialina e trasparente, non sempre continua, la quale prende poi subito forma e consistenza divenendo biancastra. La superficie ne è liscia mentre la parte immersa può essere leggermente fioccosa. Con l'agitazione non si lacera ma cade intiera verso il fondo rimanendo sospesa ad una certa altezza in seno al liquido, mentre in superficie se ne forma una nuova.

In colture vecchie la membrana può sedimentare spontaneamente e, formandosi di nuovo e così via, appare costituita, in definitiva, quasi da più strati.

È consistente e resistentissima; non si incide, infatti, con l' ago di platino ed anche con le dita oppone una certa resistenza alla lacerazione.

Non dà, ben netta, la reazione della cellulosa. Il liquido non si intorbida (o molto difficilmente) nè vi si forma deposito. In quanto alla struttura microscopica, essa è varia a seconda del mezzo in cui la membrana si origina ed interessa le variazioni morfologiche di cui sarà detto a parte.

Preme qui, piuttosto, di mettere in rilievo i caratteri differenziali delle membrane quali risultano, per *Bact. xylinum* e *Bact. Pasteurianum,* da nostre osservazioni. Con *Bact. xylinum* la membrana di *Bact. acetigenum* ha molti punti di contatto. Diremo, anzi, che

possono essere facilmente confuse tra loro [1]. Infatti, assumono uguale sviluppo e consistenza, presentano superficie liscia e fondo fioccoso, non si spezzano con l' agitazione, si ha nell'una e nell' altra formazione successiva di vari strati. Le uniche differenze potrebbero consistere nell' intorbidamento del liquido che molto difficilmente si verifica con *Bact. acetigenum* e un po' più facilmente con lo "xilino„; nell'apparenza un po' più gelatinosa nello " xilino „ ; e nel reperto della reazione della cellulosa, positivo per *Bact. xylinum* quanto non lo è, sempre, per *Bact. acetigenum.*

Trattasi di differenze, ad ogni modo, che non sempre si verificano e comunque di non facile apprezzamento. In definitiva, non tali da servire a carattere diagnostico differenziale.

D'altronde, analoghe considerazioni possono forse essere fatte per *Bact. xylinoides,* almeno per quanto si riferisce alle membrane sviluppate su acqua di lievito zuccherata, ed anche per *Bact. orleanense.*

Dalla membrana di *Bact. Pasteurianum,* invece, quella dell' "acetigeno „ si differenzia abbastanza bene essendo la prima molto meno spessa, a superficie grinzosa, e labile all' agitazione ; inoltre il *Bact. Pasteurianum,* come l' "acetigeno„, lo "xilino„ e lo "xilinoide„ ed altri non intorbida il liquido, differenziandosi per questo da *Bact. oxidans* e da *Bact. Kützingianum.*

Caratteri morfologici.

È nota la grande varietà di forme presentata dai batteri acetici. Il *Bact. acetigenum* non fa a questo eccezione.

---

[1] – *Bact. xylinum* è certamente molto diffuso ; ma, data la frequenza con la quale si rinviene anche *Bact. acetigenum,* si ritiene di dover accettare con qualche riserva le segnalazioni casistiche della prima forma quando risultino basate sull'osservazione dei caratteri della membrana o degli altri in comune.

In *agar-fagiuoli* ed *agar-malto* si presenta come bastoncini di μ (0,6 – 0,8) × (1,4 – 1,6), mobili, ma presto perdenti la mobilità, non sempre molto bene od uniformemente colorabili per la mucosità che li avvolge. Sono Gram-positivi.

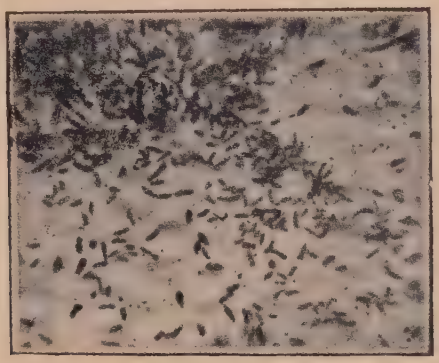

Fig. 3 – Forma normale di *Bact. acetigenum.*

In *birra* si hanno cellule isolate o accoppiate, raramente riunite in aggregati maggiori, mai in forma di fili o spirali, un poco più

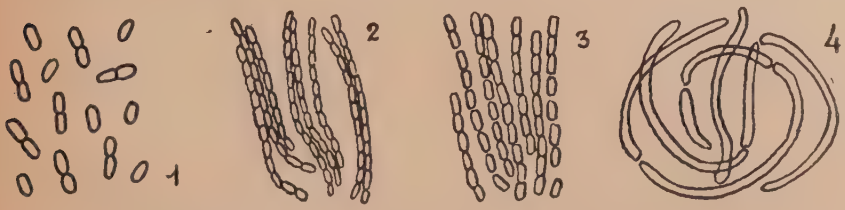

Fig. 4 – Aspetto morfologico, su birra, di *Bact. acetigenum* in confronto ad altri acetici.
1 – *Bact. acetigenum;* 2 – *Bact. acetosum;* 3 – *Bact. oxidans;* 4 – *Bact. xylinum*

grandi di quelle osservate in agar arrivando a misurare μ (1,2–1,4)× (3,2 – 3,6). Si tratta pur sempre di forme ipertrofiche, rispetto a quelle su agar, mai però di forme irregolari come si determinano in al-

tre specie. Notevole è la mancata formazione di filamenti quali si osservano presso *B. acetosum, B. oxidans, B. Pasteurianum* e, tipicamente, in *B. xylinum.* La consistenza morfologica di questi fili è, d'altronde, anche varia a seconda delle specie ricordate giacchè i filamenti di *B. acetosum* e di *B. Pasteurianum* sono lunghi e paralleli e formati da cellule cilindriche di μ 0,4 – 0,8 $\times$ 1; quelli di *B. oxidans* sono anche formati da cellule cilindriche ma più grosse, misurando μ (0,8 – 1,2) $\times$ (2,4 – 2,7) e, più facilmente disarticolantisi; infine, quelli di *B. xylinum* sono lunghi, continui, e spesso avvolti a spirale.

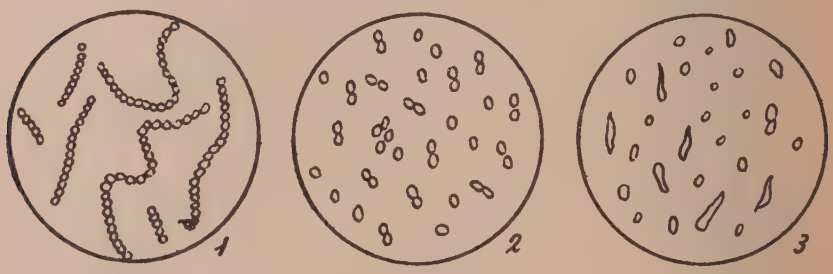

Fig. 5 – Varie forme di *Bact. acetigenum* in:
1 – inulina e glicerina; 2 – peptone; 3 – xilosio.

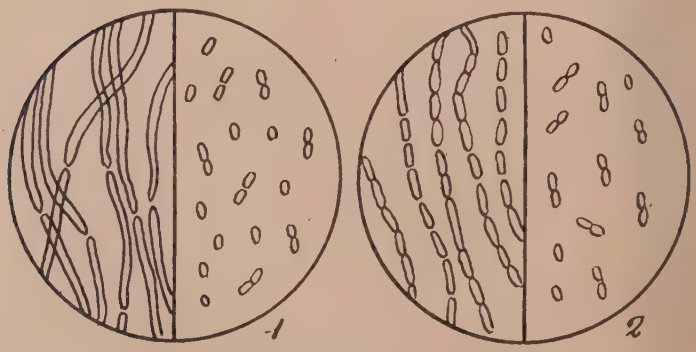

Fig. 6 – Altri aspetti morfologici di *Bact. acetigenum.*
1 – a sinistra acqua di lievito e saccarosio; a destra soluzione minerale più asparagina e saccarosio. 2 – a sinistra acqua di lievito e asparagina; a destra sol. minerale, glucosio e asparagina.

In *acqua di lievito* o in soluzione nutritiva minerale, presenti varie sorgenti di azoto o di carbonio variamente combinate, si ebbero quadri morfologici profondamente diversi.

Così, ad es., forme tondeggianti di μ 0,8 – 1,2 circa di diametro, quasi mai isolate ma di norma riunite in catena, si osservarono in presenza di inulina e di glicerina.

Forme di cocco-bacillo, spesso abbinate o riunite, si ebbero in mezzi peptonati.

Presente xilosio si notarono forme tondeggianti piccole o corte miste ad altre un poco più lunghe ad estremità, a volte, appuntite.

In mezzi minerali contenenti asparagina e vari zuccheri quali galattosio, saccarosio, lattosio, si ebbero forme normali come in birra. Invece, forme diverse, si ebbero con gli stessi zuccheri se aggiunti anzichè alla soluz. minerale, all' acqua di lievito.

Del resto, anche la sorgente azotata non è senza influenza sulla forma del germe. Già si è fissato l'aspetto morfologico che si ottiene su peptone e su asparagina. Riguardo alle sorgenti di azoto minerale, limitatamente al solfato ammonico, non risultando utilizzato il nitrato potassico, si osservarono forme grandi μ (1,2 – 1,4) × (3,4 – 3,8) isolate o riunite con una o due estremità appuntite. Questo carattere delle estremità appuntite si ripete, in parte, nelle colture in acqua di lievito contenente asparagina o raffinosio, ma quivi non trattasi di elementi separati ma disposti, invece, a catena.

Fig. 7 – Aspetto morfologico di *B. acetigenum* in presenza di solfato ammonico.

Nel complesso, quindi, grande varietà morfologica in *Bact. acetigenum* come negli altri acetobatteri. Ma, a differenza di molti di essi, mancanza di forme involutive e irregolari del tipo di quelle presentate, per es., da *Bact. acetosum*, *Bact. orleanense*, ecc..

Caratteri fisiologici e biochimici.

Anzitutto abbiamo voluto fissare le particolari esigenze alimentari con riferimento alle sorgenti carboniata ed azotata. Una prima esperienza fu effettuata seguendo il metodo delle soluzioni costanti e non costanti (in R. PEROTTI, *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura*, Roma, 1928) coltivando cioè, il germe in istudio, in soluzioni nutritizie di varia composizione.

Risultò:

TAB. II – Sviluppo di *Bact. acetigenum* in soluzioni di varia composizione [Sol. minerale base: fosfato bipotassico 1 + cloruro di calcio 0,1 + solfato di magnesio 0,3 + cloruro sodico 0,1 + cloruro ferrico 0,01 + acqua 1000].

Composizione del mezzo (% di s. m.)	sviluppo
asparagina 1	+
„ 1 + glucosio 1	+ + + +
„ 1 + saccarosio 0,5 + glicerina 1	+ + + +
KNO_3 1 + saccarosio 0,5 + glicerina 1	—
„ + glucosio 1	—
„ + glicerina 0,5	—
NH_4Cl 1 + glucosio 1	—
„ + saccarosio 0,5 + glicerina 0,5	—
tartrato ammonico 1 + saccarosio 0,5 + glicerina 1	+ +
„ 1 + glucosio 1	+ + +
lattato ammonico 0,6 + asparagina 0,4 + NaCl 0,4	+ +
peptone 1 + cl. sodico 0,2	+ +
„ 0,5 + estratto carne 1 + saccarosio 1	+ + +
„ 1 + „ + „ 0,5 + glucosio 0.5	+ + + +
„ 0,2 + solfato ammonico 0,2 + KNO_3 0,2	—

Prove analoghe furono ripetute con metodo diverso, oggi forse più in uso, e, cioè, coltivando il germe in acqua di lievito addizionata di varie sorgenti carboniate o azotate. Per queste ultime furono

anche eseguite parallelamente colture con liquido base minerale presente glucosio come sorgente di carbonio.

I risultati ottenuti sono prospettati nelle Tab. III e IV.

TAB. III – Utilizzazione da parte di *Bact. acetigenum* di varie sorgenti carboniate.

sorgente alimentare: acqua di lievito più:	sviluppo	acidità (al tornasole)
levulosio	+ + + + +	+
glucosio	+ + + + +	+
mannosio	+ + + +	+
galattosio	+ + + +	+
saccarosio	+ + + + +	+
maltosio	+ + + +	+
lattosio	+ + +	+
raffinosio	+ +	+
arabinosio	+ + +	+
xilosio	+ + +	+
alcool etilico	+ + + + +	+
alcool propilico	+ + + + +	?
glicerina	+	?
mannite	+	?
inulina	+ + + +	+
amido	+ + + +	+

TAB. IV – Utilizzazione da parte di *Bact. acetigenum* di varie sorgenti azotate addizionate all' acqua di lievito o sol. nutrit.: [Na_2HPO_4 0,3 + Mg SO_4 0,2 + NaCl 0,2 + destrosio 2 + acqua 100].

sorgente azotata:	sviluppo	
	acqua di lievito	soluz. minerale
urea	—	—
asparagina	+ + +	+ + + +
peptone	+ + + +	+ + +
nitrato potassico	—	—
solfato ammonico	+ + +	+ + +

Essi indicano come *Bact. acetigenum* utilizzi, più o meno bene, tutti gli zuccheri con formazione di acido; meno i carboidrati complessi. Utilizza anche bene gli alcool etilico e propilico come, tra i

poliossidrilici, glicerina e mannite. Forma acido anche dagli alcool. Delle sorgenti azotate non utilizza nè urea, nè nitrato potassico; bene, per contro, asparagina, peptone, solfato ammonico.

Conseguentemente parve opportuno di eseguire altre esperienze intese a stabilire l'influenza esercitata dai fosfati; e, con l'occasione, a stabilire anche meglio il comportamento del germe di fronte al nitrato potassico non senza osservare il suo sviluppo in presenza di fluoruro di potassio.

Per queste esperienze fu usato come supporto nutritivo birra distribuita in piccoli matracci. Le esperienze furono continuate per 24 giorni coltivandosi a 24°C.

Al termine del 24° giorno fu preso nota dello sviluppo. Al 12° ed anche al 24° g. fu poi dosata l' acidità calcolata sotto forma di acido acetico.

Si ottenne :

Tab. V – Influenza del nitrato potassico sullo sviluppo di *Bact. acetigenum.*

KNO_3 %	sviluppo	acidità % (in ac. acetico) al 12° g.	al 24° g.
— (controllo)	+ + +	2,478	1,879
0,5	+ + +	2,478	2,349
1,0	—	—	—
2,5	—	—	—
5,0	—	—	—

Tab. VI – Influenza del fosfato ammonico sullo sviluppo di *Bact. acetigenum.*

fosf. amm. %	sviluppo	acidità % (in ac. acetico) al 12° g.	al 24° g.
— (controllo)	+ + +	2,478	1,879
0,5	+ + +	2,478	1,333
1,0	—	—	—
2,5	—	—	—
5,0	—	—	—

TAB. VII – Influenza del fosfato monopotassico sullo sviluppo di *Bact. acetigenum*.

fosfato monopotassico %	sviluppo	acidità % (in ac. acetico) al 12° g.	al 24° g.
— (controllo)	+ + +	2,478	1,879
0,5	+ + + +	2,478	2,412
1,0	+ + + + +	3,130	3,047
2,5	+ + + + +	3,913	3,809

TAB. VIII – Influenza del fluoruro potassico sullo sviluppo di *Bact. acetigenum*.

fluoruro potassico ‰	sviluppo	acidità % (in ac. acetico) al 12° g.	al 24° g.
— (controllo)	+ + +	3,201	2,020
0,1	+ + +	3,109	3,274
0,25	+ + + +	3,456	2,620
0,50	+ + + +	1,846	2,210
0,75	+ + +	1,376	2,087
1,00	+ +	1,265	1,957
2,00	+	0,313	1,598

Da ciò deducesi che: 1°) il nitrato di potassio non solo non viene utilizzato ma, anche in piccole dosi (1 %), impedisce lo sviluppo del germe; 2°) il fosfato ammonico agisce anche sfavorevolmente con comportamento analogo al nitrato di potassio; 3°) il fosfato monopotassico stimola lo sviluppo del microrganismo; 4°) il fluoruro potassico, infine, agisce come stimolante se aggiunto in piccole dosi (fino allo 0,25‰), altrimenti come deprimente.

Ulteriori prove furono effettuate onde osservare il comportamento nel vino, in relazione sopratutto al suo titolo alcoolico, dato che preliminari tentativi di coltura in vino puro avevano dato esito negativo relativamente allo sviluppo. All'uopo fu distribuito in una serie di matraccini vino, progressivamente diluito, contenente inizialmente il 10,8 % di alcool.

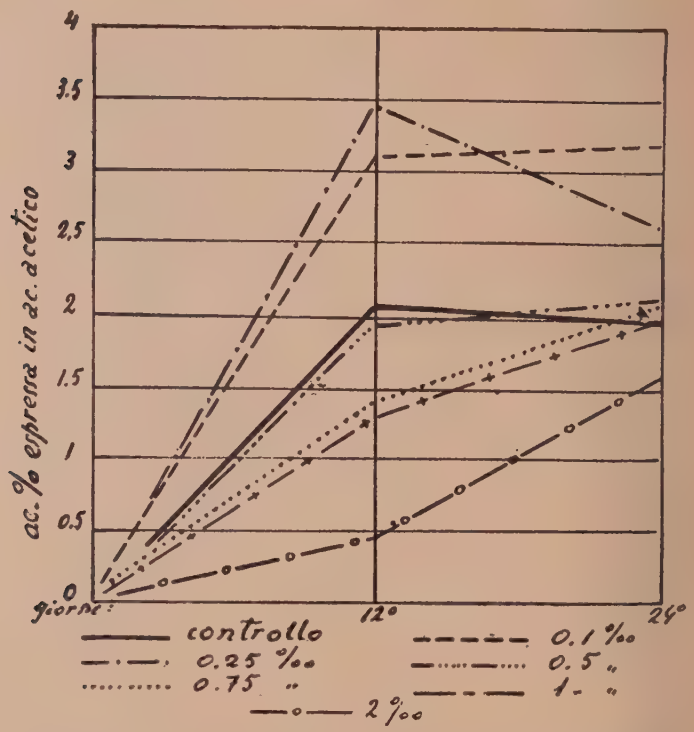

Fig. 8 – Influenza del fluoruro pōtassico sul rendimento in ac. di *B. acetig.*

Dopo un sufficiente numero di giorni di coltura a 24°C. fu notato quanto segue:

Tab. IX – Sviluppo di *Bact. acetigenum* in vino variamente annacquato.

Diluizioni:	alcool % corrispondente	sviluppo
100 vino	10,80	—
90 „ + 10 acqua	9,72	—
80 „ + 20 „	8,64	—
70 „ + 30 „	7,56	+
60 „ + 40 „	6,48	+ +
50 „ + 50 „	5,40	+ + +
40 „ + 60 „	4,32	+ + + +
30 „ + 70 „	3,24	+ + + +
20 „ + 80 „	2,16	+ + +
10 „ + 90 „	1,08	+ +

L'esperienza indica come *Bact. acetigenum* non si sviluppi in vino contenente oltre l' 8 % di alcool. Ciò, naturalmente, doveva portare a stabilire meglio l'influenza dell'alcool.

In una serie di prove esso fu aggiunto, allora, in varie percentuali o ad acqua di lievito o alla soluz. nutritiva minerale. Dopo 15 giorni di coltura a 24°C. fu notato lo sviluppo e dosata l'acidità prodotta. I risultati figurano nella tabella X.

TAB. X – Influenza dell'alcool sullo sviluppo di *Bact. acetigenum*.

	sviluppo	acidità % (espr. in ac. acetico)		
		iniziale	al 15° g.	differenza
acqua di lievito	+	0,0120	0,0429	0,0309
„ „ + 1 % alcool	+	0,0120	0,6607	0,6487
„ „ + 2,5 „	+	0,0120	0,8478	0,8358
„ „ + 5 „	—	0,0120	0,0120	—
sol. minerale	+	0,0240	0,1883	0,1643
„ „ + 1 % alcool	+	0,0240	0,6812	0,6572
„ „ + 2,5 „	+	0,0240	0,2869	0,2629
„ „ + 5 „	—	0,0240	0,0240	—

Fu confermata la scarsa tollerabilità del germe rispetto all'alcool etilico. Riguardo allo sviluppo fu notato che esso meglio si determina in presenza di acqua di lievito che non di soluzione minerale.

Apparendo tuttavia scarsa la quantità di alcool tollerata si volle indagare il suo potere di adattamento a dosi crescenti di tale composto anche al fine di giustificare la sua presenza negli aceti di vino da cui fu isolato. All'uopo furono eseguiti trapianti successivi in mezzi contenenti quantità sempre più elevate di alcool ottenendosi in ogni caso reperto positivo (v. tabella XI).

In tema di tollerabilità e di adattamento si è voluto anche indagare il modo di comportarsi di *Bact. acetigenum* di fronte all' acido acetico. Per questo si coltivò il germe in acqua di lievito o in soluzione minerale addizionate di quantità crescenti di ac. acetico.

Lo sviluppo si mostrò positivo, nella prima esperienza, nei recipienti contenenti fino al 2,5 % di acido e non oltre. Successivi trapianti, però, di queste ultime colture, in mezzi più acidificati dimostrarono – come è stato visto per l'alcool – la possibilità di adattamento almeno fino al 7 % che fu la concentrazione massima sperimentata.

TAB. XI – Rendimento in acido di *Bact. acetigenum* progressivamente adattato a quantità crescenti di alcool presente in acqua di lievito o sol. minerale.

	sviluppo (1)	acidità % (espr. in ac. acetico)		
		iniziale	al 15° g.	differenza
acqua di liev. + 5 % alcool	+	0,0120	0,9130	0,9010
" " + 8 "	+	"	1,0435	1,0315
" " +10 "	+	"	0,9648	0,9528
" " +12 "	+	"	0,9482	0,9362
sol. minerale + 5 % "	+	0,0240	0,3587	0,3347
" " + 8 "	+	"	0,7956	0,7716
" " +10 "	+	"	0,6522	0,6282
" " +12 "	+	"	0,6245	0,6005

(1) – Trattasi, come è indicato nel testo, di sviluppo conseguente a successivi adattamenti.

Ulteriore prova fu quella di stabilire l'influenza esercitata dalla temperatura. Allo scopo *Bact. acetigenum* fu seminato in bevute contenenti birra o vino e coltivato per 24 g. a 15° C., e a 33° C. Il vino venne preliminarmente annacquato al 30 % per abbassarne il titolo alcoolico che si dimostrò essere, avvenuto l' annacquamento, del 7,56 %. Al 12° ed al 24° g. fu titolata l'acidità totale libera e l'acidità volatile totale.

Risultò :

TAB. XII – Influenza della temperatura sul rendimento in acido di *Bact. acetigenum.*

	a 15° C.		a 24° C.		a 33° C.	
	acidità % espressa in ac. acetico					
	totale libera	volatile totale	totale libera	volatile totale	totale libera	volatile totale
Vino al 12° g. .	0,76	0,46	1,83	0,63	—	—
„ al 24° g. .	2,90	2,04	3,30	2,74	—	—
Birra al 12° g. .	0,90	0,59	3,15	3,04	—	—
„ al 24° g. .	3,01	2,59	2,47	2,59		

Alla temperatura di 33° C. non si ebbe sviluppo. Delle altre temperature, sia su birra che su vino, la temp. di 24° C. si dimostrò migliore sull'altra di 15° C. A questa temperatura non notevoli differenze si osservarono nelle curve di acetificazione della birra e del vino. Per contro, a 24° C., si notò una più pronta acetificazione nella birra salvo verificarsi dopo, però, un leggero consumo di acido.

Un'ultima esperienza fu quella di determinare la natura dell' acidità volatile quale si desume dalle curve di distillazione ottenute seguendo il metodo DUCLAUX.

All'uopo *Bact. acetigenum* fu seminato in grandi palloni contenenti birra o vino (puro o diluito al 30 %) che si coltivarono a 24° C. per 24 giorni. Al termine del 24° come del 12° g. fu eseguita la distillazione predetta ottenendo i risultati espressi in Tab. XIII.

Tali risultati indicano che le curve ottenute si approssimano, naturalmente, alla curva tipica dell'acido acetico salvo piccolissimi scarti. Questi stanno ad indicare come accanto all'acido acetico si formino tracce di altri acidi volatili.

TABELLA XIII.

Curva di distillazione degli acidi volatili formati da *Bact. acetigenum* in birra e vino.

Frazione del distillato	Birra				Vino diluito 30 %				Vino puro				Confronto con le percentuali progressive di ac. acetico (sec. Duclaux)
	al 12° g.		al 24° g.		al 12° g.		al 24° g.		al 12° g.		al 24° g.		
	parz.	progr.	parz.	progr.	parz.	progr.	parz.	progr.	parz.	progr.	parz.	progr.	
1	5,8	5,8	8,0	8,0	6,34	6,34	6,39	6,39	7,41	7,41	7,47	7,47	7,4
2	7,0	12,2	9,5	17,5	7,63	13,97	7,43	13,82	7,93	15,34	7,99	15,46	15,2
3	8,0	20,6	8,7	26,2	8,10	22,07	7,61	21,43	7,74	23,08	8,68	24,14	23,4
4	8,4	29,0	8,7	34,9	8,57	30,64	8,32	29,75	8,72	31,80	8,69	32,83	32,0
5	8,8	37,8	8,7	43,7	9,05	39,69	8,01	37,76	9,20	41,00	8,93	41,76	40,9
6	9,5	47,3	9,2	52,9	9,63	49,32	9,04	46,80	9,54	50,54	9,31	51,07	50,5
7	10,5	57,8	9,8	62,7	10,39	59,71	8,78	55,58	10,05	60,35	10,27	61,34	60,6
8	11,4	69,2	10,6	73,3	11,86	71,57	13,75	69,33	11,40	71,99	11,19	72,53	71,9
9	13,2	84,4	11,7	85,1	12,92	84,49	12,71	82,04	12,60	84,59	12,60	85,13	84,4
10	17,6	100,0	14.8	100,0	15,51	100,00	17,96	100,00	15,41	100,00	14,87	100,00	100,0

* * *

Riassumendo, nella presente Nota è stata preliminarmente discussa la sistematica degli acetobatteri della quale appare necessaria una rielaborazione tenendosi conto, come fin ora non è stato fatto, dei caratteri colturali.

Studiati quattro aceti di varia provenienza, sono stati isolati ceppi di lieviti, dei quali verrà a parte riferito, e ceppi di acetici riportabili alle specie di *Bact. acetigenum, Bact. xylinum, Bact. Pasteurianum.*

Particolarmente studiata la prima specie sono stati di essa fissati, con qualche dettaglio, i caratteri colturali, morfologici e biochimici.

Per quanto si riferisce ai primi è stato descritto il tipico sviluppo delle colonie e delle patine su agar inclinato sottolineando il singolare rigoglio vegetativo in confronto con altre specie che dànno, invece, patine esigue.

Altresì è stato descritto il modo di formarsi delle membrane in mezzi liquidi; membrane notevolmente spesse, cuoiacee, resistenti. All'agitazione non si frammentano, nè cadono completamente al fondo; rimangono sospese in seno al liquido, mentre in superficie se ne formano, via via, di nuove. La reazione della cellulosa non è netta. Il liquido rimane limpido. Per quanto si riferisce ai caratteri morfologici, il *Bact. acetigenum* presenta, come gli altri acetici, un quadro morfologico assai vario che va dalle forme rotonde, isolate o a catena, a forme di cocco-bacillo o di bacillo, talvolta ad estremità appuntite, fino a forme filamentose in dipendenza della natura del mezzo. Non si osservano, tuttavia, frequenti forme di involuzione come è facile riscontrare, invece, in altre specie di acetici.

Indagate quali fossero le sorgenti alimentari più adatte è stato osservato che i composti carboniati sperimentati vengono tutti, più o meno bene, utilizzati, con formazione di acido. Delle sorgenti azotate è utilizzato l'azoto proteico, amidico, non dell'urea e dei nitrati. La presenza di questi, anzi, ostacola lo sviluppo del germe o la sua attività.

Influenza favorevole esercitano, invece, aggiunte di fosfato potassico. Il fluoruro di potassio si comporta, per piccole aggiunte, come stimolante, altrimenti come deprimente lo sviluppo e il rendimento.

Studiata l'influenza della temperatura, l'ottima risultò essere quella di 24° C.. A 33° C. il germe non si sviluppa.

Coltivato in birra e in vino è stato osservato che, mentre si sviluppa molto bene nella birra, non ugualmente bene si sviluppa nel vino

in relazione al contenuto in alcool. La presenza di questo composto non è risultata, infatti, molto tollerata. Tuttavia il *Bact. acetigenum* offre di fronte all'alcool etilico (come all'ac. acetico) un grande potere di adattamento.

Ricercata la natura dell'acidità volatile, quale si desume dall' esame delle curve di distillazione ottenute seguendo il metodo DUCLAUX, si è rilevato come, accanto all'acido acetico, si formino tracce di altri acidi volatili.

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia vegetale e Microbiologia agraria e tecnica

(Presentata il 3 Agosto 1938 - XVI)